TaqMan® Small RNA Assay

TaqMan® MicroRNA Assay、TaqMan® siRNA Assay および Custom TaqMan® Small RNA Assay

注意：安全およびバイオハザードに関するガイドラインについては、*TaqMan® Small RNA Assay プロトコール*（製品番号 4364031）の「安全性」のセクションをご参照ください。すべての化学物質について安全性データシート（SDS）を読み、取扱説明書に従ってください。適切な保護眼鏡、保護衣および保護手袋を着用してください。

逆転写（RT）を行う

1 total RNA を調製する

a. total RNA を抽出します。
small RNA が保存されるような方法を利用してください。small RNA より長いコントロール転写物（snoRNA）のロスを防ぐためには、サイズによる選別を行わないことを推奨します。

b. サンプル中に含まれる total RNA 量を定量します。

2 RT マスターミックスを調製する

a. TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit の試薬を氷上で解凍します。100mM dNTPs と 10X Reverse Transcription Buffer は解凍後チューブを穏やかに反転して混合しスピンダウンした後、氷上に戻します。MultiScribe™ Reverse Transcriptase と RNase Inhibitor はスピンダウンのみ行い、氷上に戻します。

b. RT 反応数に応じて以下の表に記載されている容量を調整し、氷上でポリプロピレン製チューブ内に RT マスターミックスを調製します。ピペッティングによるロスを考慮して、10～20%過剰に調製することを推奨します。

試薬	反応液15 µLあたりのマスターミックス容量[†]
100 mM dNTPs (with dTTP)	0.15 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL	1.00 µL
10× Reverse Transcription Buffer	1.50 µL
RNase Inhibitor, 20 U/µL	0.19 µL
Nuclease-Free Water	4.16 µL
合計	**7.00 µL**

[†] マスターミックス7 µLに5× RT Primer 3 µLとRNAサンプル5 µLを加えるので、合成RT反応液は15 µLになります。

c. 穏やかに混合します。遠心して、溶液をチューブの底に落としてください。

d. RT マスターミックスは、RNA 反応液を調製するまで氷上に置きます。

3 RT 反応液を調製する

a. 5× RT Primer と RNA テンプレートを氷上で解凍します。使用前に RT Primer のチューブをボルテックスして混合した後、スピンダウンしてください。

b. 定量しようとする RNA の種類によって、以下の指示に従ってください。
- Ambion *Silencer®* Select siRNA を定量する場合は、ステップ c に進んでください。
- その他のすべてのテンプレートについては、ステップ d に進んでください。

3 RT 反応液を調製する（続き）

c. Ambion *Silencer*® Select siRNA を定量する場合には、二本鎖テンプレートを変性および調製します。
1. 15 µL の各 RT 反応液につき、0.2 mL 反応チューブまたは 96 ウェルの反応プレート内で 5× RT Primer 3 µL と二本鎖テンプレート 5 µL を混合します。
2. チューブまたはプレートを 85℃で 5 分間インキュベート後、60℃で 5 分間インキュベートします。
3. 変性後のテンプレートを氷上に置きます。
4. 15 µµL の各 RT 反応液につき、以下の比率で RT マスターミックスに変性後の RNA と RT Primer を混合します。
RT マスターミックス 7 µL：変性後の RNA および RT プライマー8 µL（1 反応あたりの RNA 量は 1〜10 ng）
5. ステップ e に進んでください。

d. 一本鎖 RNA を調製している場合には、total RNA テンプレートを調製します。
1. 15 µL の各 RT 反応液につき、以下の比率で RT マスターミックスと total RNA 1〜10 ng を混合します。
RT マスターミックス 7 µL：total RNA 5 µL
2. 穏やかに混合した後、スピンダウンして溶液をチューブの底に落とします。
3. RT マスターミックス−total RNA 混合液 12.0 µL を 0.2 mL 反応チューブまたは 96 ウェルの反応プレートに移します。
4. 各アッセイのセットに付属の 5× RT Primer 3 µL を対応する RT 反応チューブまたはウェルに加えます。
5. ステップ e に進んでください。

e. 反応チューブまたは反応プレートを密閉した後で穏やかに混合し、スピンダウンします。

f. 反応液を氷上で 5 分間インキュベートした後、サーマルサイクラーにセットするまで氷上に置きます。

4 逆転写を行う

反応チューブまたは反応プレートをサーマルサイクラーにセットした後、以下の条件で逆転写を行います。

- モード：Standard
- 反応液量：15 µL
- サーマルサイクリング条件：

ステップ	時間	温度
ホールド	30 min	16°C
ホールド	30 min	42°C
ホールド	5 min	85°C
ホールド	∞	4°C

定量 PCR（qPCR）増幅

1 qPCR 反応液の調製

a. 各試薬を氷上に置きます。チューブを穏やかに反転して混合しスピンダウンした後、氷上に戻します。

b. 反応液量 20 μL と反応数から、必要な容量を算出します。

注意：各反応は 3 反復で実施することを推奨します。また試薬を移すときに生じるロスを考慮して、必要な容量に過剰分を含めることを推奨します。

試薬	容量（μL）	
	反応液量20 μLの場合	3反復＋20%の過剰分
TaqMan® Universal PCR Master Mix II, no UNG†	10.00 μL	36.00 μL
Nuclease-Free Water	7.67 μL	27.61 μL
TaqMan® Small RNA Assay (20×)	1.00 μL	3.60 μL
RT 反応産物	1.33‡ μL	4.80 μL
合計容量	**20.00 μL**	**72.01 μL**

† TaqMan Universal PCR Master Mix II with UNG は TaqMan® Small RNA Assay に対応しています。
‡ 各反応液に添加できるRT産物の最大容量。

c. マイクロ遠心チューブ内で反応試薬を混合します。

d. 穏やかに転倒混和して混合した後、チューブまたはプレートをスピンダウンします。

2 qPCR 反応プレートを調製する

a. PCR 反応液 20 μL を反応プレートのウェルに移します。

b. 反応プレートを Optical Adhesive Film または Optical Cap で密閉した後、スピンダウンします。

3 PCR 反応プレートのサーマルサイクリングを行う

a. 以下のパラメータを使用して実験ファイルまたはプレートドキュメントを作成します。
- モード：Standard
- 反応液量：20 μL
- サーマルサイクリング条件：

ステップ	AmpErase® UNG の活性化（オプション）†	酵素の活性化	PCR	
	ホールド	ホールド	サーマルサイクリング（40 cycles）	
			変性	アニーリング／伸長
温度	50°C	95°C	95°C	60°C
時間	2 min	10 min	15 sec	60 sec

† UNG が反応液に含まれない場合は不要です

b. 反応プレートをリアルタイム PCR 装置にセットします。

c. ランを開始します。

4 実験結果を解析する

実験結果の解析については、ご利用のリアルタイム PCR システムに関するスタートガイドをご参照ください。遺伝子発現アッセイから得られたデータを解析するには、一般に以下の手順を実施します。

a. Amplification Plot を表示します。

b. Baseline と Threshold を設定します。